

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 641 545

(21) N° d'enregistrement national :

89 00209

(51) Int Cl⁵ : C 12 P 7/18; C 12 M 1/00 // A 23 L 1/236. (C 12
P 7/18, C 12 R 1:72).

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 10 janvier 1989.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 28 du 13 juillet 1990.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

(71) Demandeur(s) : AGROCINO, Société à responsabilité li-
mitée. — FR.

(72) Inventeur(s) : Pierre Strehaiano ; Marie-Line Dupuy.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Ayache.

(54) Procédé de biosynthèse du xylitol.

(57) L'invention a pour objet un procédé de production du
xylitol à partir de D-xylose par action de la souche de *Candida*
parapsilosis ATCC28474, caractérisé en ce qu'il comprend les
étapes consistant à :

1. cultiver un inoculum de 2 à 5.10⁸ cellules/-ml de *C.*
parapsilosis ATCC28474, en aérobie, à une température de 25
à 35 °C, pendant le temps nécessaire à la consommation du
sucre, à un pH maintenu dans la gamme de 3,8 à 5,4, dans un
fermenteur contenant : soit un milieu synthétique comprenant
30 à 100 g/l de D-xylose, 2 à 10 g/l de KH₂PO₄, 1 à 5 g/l de
(NH₄)₂SO₄ et 0,1 à 1 g/l de MgSO₄ 7H₂O, soit un hydrolysat
de matières premières végétales comprenant 50 à 80 g/l de
D-xylose, en présence de 0,5 à 3 g/l d'extrait de levure, dans
des conditions d'aération et d'agitation assurant un apport en
oxygène tel que la bioconversion du D-xylose en xylitol soit
assurée, sans permettre la réutilisation du xylitol par la levure,
et

2. isoler le xylitol à partir du milieu de culture.
Application à la biosynthèse industrielle du xylitol.

FR 2 641 545 - A1

D

Procédé de biosynthèse du xylitol

L'invention a pour objet un procédé industriel de biosynthèse du xylitol.

5 Le xylitol est un sucre-alcool à cinq atomes de carbone, de formule brute $C_5H_{12}O_5$, obtenu essentiellement par réduction du xylose.

Très voisin du saccharose par son pouvoir sucrant et sa valeur alimentaire, cet édulcorant possède
10 certaines propriétés physiques, chimiques et biochimiques qui justifient l'intérêt que les hygiénistes et diététiciens lui accordent depuis environ dix ans, notamment son inactivité vis-à-vis des processus de formation de la carie dentaire et son métabolisme indépendant
15 de l'insuline, ce qui permet son utilisation par les diabétiques.

Il convient également de noter son inertie chimique vis-à-vis de la réaction de Maillard. En effet, ne possédant pas de groupement carbonyle réducteur, il ne
20 peut réagir avec les acides aminés pour donner des produits bruns. De plus, s'agissant d'un monosaccharide, il ne peut, contrairement au saccharose, subir une inversion, ce qui autorise son emploi en milieu acide, sans risque d'altération. Enfin, sa température d'ébullition
25 de 95°C peut être atteinte sans dénaturation, ce qui présente l'avantage important de n'avoir pas à le dissoudre dans l'eau, par exemple pour l'utiliser dans des enrobages.

Le xylitol existe à l'état naturel dans de nombreux fruits et légumes, mais à des concentrations tellement faibles que son extraction à partir de telles sources ne peut être envisagée au plan industriel.

Compte tenu de cette impossibilité d'obtenir industriellement du xylitol par extraction, on s'est
35 adressé à sa synthèse à partir d'un produit facilement accessible, le xylose qui peut lui-même être obtenu

aisément à partir de produits naturels.

L'obtention du xylitol est basée sur la transformation, en quatre étapes, des xylanes de la matière végétale, selon le schéma général suivant :

- 5 - hydrolyse des matières premières ;
 - purification de l'hydrolysate pour obtenir du
xylitol pur ;
 - hydrogénation du xylitol en xylitol ; et
 - cristallisation du xylitol.

- 10 Il est en principe possible d'obtenir le xylitol
par réduction du xylitol selon trois voies différentes, à
savoir la voie chimique, la voie biochimique et la voie
biologique.

- 15 La voie chimique consiste en une hydrogénation
catalytique des "complexes sucre". Elle peut être réa-
lisée par le borohydrure de sodium, ou plus classique-
ment par le nickel de Raney, dans des conditions de
température et de pression variables d'une technique à
l'autre.

- 20 Selon la voie chimique, quelle que soit la
technique particulière utilisée, en fin de réaction on
est en présence d'un mélange de polyalcools dont le
xylitol, en proportion plus ou moins élevée, doit être
extrait. Actuellement, on ne dispose pour ce faire que
25 de techniques lourdes à mettre en oeuvre telles que la
chromatographie suivie d'une cristallisation.

- Les spécialistes en ce domaine ont donc, depuis
quelques années, conscience de l'intérêt qu'il y aurait
à développer une technique industrielle d'hydrogénation
30 sélective du xylitol en xylitol. On a pour ce faire eu
l'idée d'avoir recours à des procédés biochimiques ou
biologiques.

- Les procédés biochimiques n'ont pu jusqu'à
présent être développés en raison notamment des doutes
35 qu'il existe quant à la sécurité de l'utilisation
d'enzymes pour la fabrication de produits industriels

destinés à l'usage alimentaire.

Les procédés biologiques devraient pouvoir apporter une solution satisfaisante aux problèmes inhérents aux autres techniques, tels que réduction non sélective des sucres dans les procédés chimiques et incertitudes quant à la sécurité des procédés biochimiques.

L'hydrogénation des sucres en alcool par voie biologique présente une spécificité marquée. Ainsi, partant d'une solution hétérogène de sucres, on peut envisager de ne réduire que le xylose ou xylitol, les autres sucres restant inchangés. La purification ultérieure du xylitol s'en trouvera considérablement simplifiée.

On savait que certaines levures cultivées sur un milieu contenant du D-xylose comme sources de carbone et d'énergie produisent du xylitol comme produit secondaire métabolique. Partant de cette connaissance, on a eu l'idée de rechercher des souches naturelles ou mutantes de levures qui, au lieu de l'éthanol, seraient capables de produire, au moins dans certaines conditions, principalement, ou si possible exclusivement, du xylitol à partir de D-xylose.

C'est ainsi que Cheng-Shung GONG et coll. ont présenté dans Biotechnology Letters, 3(3), 130-135 (1981) une souche mutante de Candida tropicalis capable de produire, de manière quantitative, du xylitol à partir de D-xylose. D'après les résultats annoncés, cette souche permet de convertir en xylitol 96 % du D-xylose consommé, lorsqu'elle est cultivée en aérobie dans un milieu YME (Yeast = levure, Malt, Extract-peptone = extrait de peptone) contenant du D-xylose. Le milieu en question est en fait très riche puisqu'il contient 3 g/l d'extrait de levure, 3 g/l d'extrait de malt et 5 g/l de peptone. Les résultats annoncés ont été obtenus sur 100 ml et le niveau d'ensemencement ainsi que les conditions d'aération ne sont pas précisés.

Aucune indication n'est donnée quant aux possibilités d'une éventuelle transposition de cette production en erlenmeyer de 250 ml à une production industrielle. De toute façon, à supposer même qu'une telle
5 transposition soit possible, la richesse du milieu utilisé interdirait toute exploitation industrielle rentable. De plus, il est à craindre que l'utilisation d'une souche mutante ne se heurte à des interdictions administratives.

10 S'intéressant toujours au problème de la conversion biologique du D-xylose en xylitol, GONG et coll. ont examiné vingt souches de Candida appartenant à onze espèces différentes. Les résultats de leur étude sont résumés dans Biotechnology and Bioengineering 25, 85-102
15 (1983). Il y est indiqué que les bons producteurs de xylitol sont Candida parapsilosis ATCC28474 et les cinq souches de Candida tropicalis testées.

Ici encore, le milieu de culture utilisé est très riche (c'est le même que précédemment). Son volume
20 est encore plus faible (10 ml) et les conditions d'aération ne sont pas précisées. Au surplus, l'inoculum utilisé est très important (1 à $3 \cdot 10^8$ cellules/ml), ce qui exclut, compte tenu des coûts de préparation de l'inoculum, toute transposition industrielle rentable, à
25 supposer même qu'elle soit techniquement possible, les étapes du procédé n'étant pas indiquées.

Par la suite Li-Fu CHEN et Cheng-Shung GONG ont étudié la possibilité d'obtenir du xylitol par voie biologique, à partir d'hydrolysats de canne à sucre. Dans
30 Journal of Food Science 50, pages 226-228 (1985), ils décrivent l'utilisation d'une souche non identifiée, Candida sp B-22, "acclimatée" aux hydrolysats d'hémicellulose. Le rendement par rapport au xylose consommé est satisfaisant (91,9 %). Toutefois, le milieu de culture
35 utilisé est non seulement additionné de glucose (30 g/l) et d'arabinose (47 g/l) mais comprend en outre une forte

proportion de produits coûteux (extrait de levure : 3 g/l ; malt : 3 g/l ; peptone : 5 g/l). Les conditions de mise en oeuvre du procédé sont ici mieux précisées mais on constate ainsi que trois corrections de pH successives (10, 4 et 6) et une centrifugation sont nécessaires. Enfin la taille de l'inoculum utilisé (4.10^9 cellules/ml) est telle qu'il est impensable de l'appliquer industriellement. En conclusion, il ne peut être envisagé de transposer au plan industriel ce procédé réalisé ici sur 20 ml de milieu dans un erlenmeyer de 50 ml.

Ainsi donc, les essais réalisés jusqu'à ce jour en laboratoire pour transformer le D-xylose en xylitol par voie biologique, bien que montrant qu'une telle transformation quasi-sélective est possible, n'ont pas permis la mise au point d'un procédé utilisable à l'échelle industrielle.

Selon l'invention, on a trouvé qu'il était possible, grâce à une combinaison appropriée de paramètres déterminant les conditions opératoires, de produire du xylitol à l'échelle industrielle, à partir d'un milieu naturel ou synthétique peu coûteux, contenant du D-xylose, en utilisant la souche de Candida parapsilosis ATCC28474 pour la bioconversion de ce D-xylose en xylitol.

Ainsi l'invention a pour objet un procédé de production du xylitol à partir de D-xylose par action de la souche de Candida parapsilosis ATCC28474, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

1°. cultiver un inoculum de 2 à 5.10^6 cellules/ml de C. parapsilosis ATCC28474, en aérobie, à une température de 25 à 35°C, pendant le temps nécessaire à la consommation du sucre, à un pH maintenu dans la gamme de 3.8 à 5.4, dans un fermenteur contenant :

soit un milieu synthétique comprenant
- 30 à 100 g/l de D-xylose.

- 2 à 10 g/l de KH_2PO_4 .
- 1 à 5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et
- 0,1 à 1 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

soit un hydrolysats de matières premières végétales comprenant 50 à 80 g/l de D-xylose.

5 en présence de 0,5 à 3 g/l d'extrait de levure, dans des conditions d'aération et d'agitation assurant un apport en oxygène tel que la bioconversion du D-xylose en xylitol soit assurée, sans permettre la

10 réutilisation du xylitol par la levure, et

2°. isoler le xylitol à partir du milieu de culture.

L'inoculum utilisé selon l'invention, de l'ordre de 10^6 cellules/ml, est nettement plus faible que ceux

15 utilisés selon l'art antérieur (de l'ordre de 10^8 et 10^9 cellules/ml, respectivement), il est avantageusement de $3 \cdot 10^6$ cellules/ml.

La température de culture et de bioconversion peut être choisie dans la gamme de 25 à 35°C et se situe

20 de préférence dans la gamme de 27 à 32°C ; des résultats particulièrement avantageux ont été obtenus à 30°C.

La durée de la culture qui se situe le plus généralement entre 50 et 200 h, dépend essentiellement de la quantité de xylose à convertir ; la fin de la réaction

25 tion peut être aisément déterminée par l'homme du métier grâce à des prélèvements réguliers d'échantillons.

Selon l'invention, on n'effectue pas de corrections de pH successives au cours de la mise en oeuvre du procédé. Une correction initiale est effectuée si nécessaire, par exemple pour régler le pH à 4,5 et une correction

30 continue, pour le maintenir à l'intérieur de la gamme de 3,8 à 5,4 et de préférence à la valeur définie au départ, par exemple 4,5, est effectuée au moyen d'un système usuel de régulation du pH.

35 Les hydrolysats de matières premières végétales

qui peuvent être utilisés selon l'invention peuvent provenir de matières riches en xylanes d'origines très variées (bois, graines et enveloppes notamment). Il peut s'agir par exemple d'hydrolysats de maïs, de sorgho ou de tout autre hydrolysats d'origine végétale, riche en D-xylose. Ces hydrolysats peuvent être obtenus de manière classique, bien connue de l'homme du métier, par hydrolyse chimique, notamment par l'acide sulfurique ou l'acide chlorhydrique, par exemple selon le procédé Bergius-Rheinau décrit dans les brevets US 2 917 390 et 2 989 569.

Quel que soit le milieu de culture utilisé, milieu synthétique ou hydrolysats, on l'additionne d'extrait de levure, qui a un effet important sur les rendements et les vitesses de réaction, mais en une quantité modérée, limitée dans la majorité des cas à 1 g/l.

Il est intéressant de noter que contrairement aux procédés de l'art antérieur, le procédé selon l'invention ne requiert la présence ni d'extrait de malt, ni de peptone.

Afin d'économiser le D-xylose et d'augmenter sa conversion en xylitol on peut, selon un mode avantageux de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, effectuer la culture et la bioconversion sur un substrat carboné mixte contenant notamment du glucose.

Avantageusement, ce substrat carboné mixte, dans un milieu synthétique, est constitué de :

- 90 à 95 % de xylose, et
- 10 à 5 % de glucose.

Dans ces conditions, la croissance de la levure a lieu essentiellement aux dépens du glucose et le xylose est converti en xylitol dans un stade ultérieur à la phase de croissance active.

L'utilisation d'un substrat carboné mixte permet aussi de valoriser au mieux les hydrolysats de produits naturels, hétérogènes dans leur composition glucidique

(xylose 80 à 90 % ; glucose 10 à 20 %, par exemple).

Les conditions d'agitation et d'aération optimum sont liées entre elles d'une part, et dépendent de la structure du fermenteur utilisé, d'autre part. Elles
5 peuvent être aisément déterminées par l'homme du métier sur la base de ses connaissances générales en la matière, par des essais préliminaires.

En tout état de cause, elles doivent être telles qu'il n'y ait dans le milieu ni carence en oxygène qui
10 bloquerait la synthèse du xylitol, ni excès d'oxygène qui favoriserait la réutilisation du xylitol par la levure, diminuant ainsi la production du xylitol.

Bien que des conditions d'aération et d'agitation applicables à tous les fermenteurs ne puissent être
15 précisées, on peut indiquer que dans la plupart des cas, les conditions optimales d'aération seront de 0,25 à 0,45 volume d'air/volume de liquide/minute (ou vol. d'air/vol. liq./min. ou encore vvm) et les conditions optimales d'agitation seront de 200 à 500 tr/min.

En fin de bioconversion, le xylitol est isolé du milieu de culture en mettant en oeuvre un procédé classique d'extraction-purification, comme par exemple celui
20 décrit dans le brevet 68 1 532 101.

Les effets de l'aération sur la productivité en
25 xylitol de la réaction et le rendement de la conversion sont illustrés dans le tableau I de la partie expérimentale qui suit.

Selon un mode avantageux de réalisation, le procédé selon l'invention est mis en oeuvre selon un
30 "découplage" partiel entre la croissance de la levure et la réaction de conversion du xylose en xylitol, ce qui conduit à un procédé de production par cultures successives permettant d'obtenir des biomasses plus importantes. Le tableau III de la partie expérimentale qui suit
35 montre les gains ainsi réalisés, en termes de rendement et de productivité.

Le tableau IV de la partie expérimentale qui suit montre que le xylitol n'a pas d'effet inhibiteur sur sa propre production. Par conséquent, selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, le procédé est mis en oeuvre avec un apport programmé de substrat, c'est-à-dire selon le mode dit "fed-batch".

Le procédé selon l'invention peut avantageusement être mis en oeuvre dans un fermenteur de 200 à 10 000 litres, comprenant essentiellement une cuve munie d'une ouverture à la partie supérieure, d'un système de vidange à la partie inférieure, d'un système de remplissage commandé par une horloge ou un micro-ordinateur, avec éventuellement un capteur multiétagé permettant des apports successifs de milieu, d'un système de double régulation du pH par un acide et une base, d'un système de régulation de la température interne, d'un système d'aération, d'un système d'agitation et d'un dispositif de mesure de l'oxygène à l'intérieur de la cuve.

La description qui suit d'exemples de réalisation de l'invention est destinée à l'illustrer et mieux l'expliquer, sans en limiter aucunement la portée.

Données générales

Dans les études décrites ci-après, les différentes valeurs données dans les tableaux sont calculées comme suit, à partir des dosages effectués sur des prélèvements :

- rendement R_X en biomasse, X : g/l

$$R_X = \frac{X_{\text{final}} - X_{\text{initial}}}{\text{Xylose}_{\text{initial}} - \text{Xylose}_{\text{final}}} \quad (\text{g/g})$$

10

- rendement R_p en xylitol :

$$R_p = \frac{\text{Xylitol}_{\text{final}} - \text{Xylitol}_{\text{initial}}}{\text{Xylose}_{\text{initial}} - \text{Xylose}_{\text{final}}} \quad (\text{g/g})$$

- productivité, ou vitesse moyenne de production du xylitol :

$$P = \frac{\text{Xylitol}_{\text{final}}}{\text{Temps de réaction}} \quad (\text{g/l/h})$$

Note 1 : les masses de xylitol et de xylose sont en g/l

Note 2 : les calculs de rendements sont effectués sur le substrat carboné seul ; on peut en effet négliger dans le bilan la part de l'extrait de levure apporté : 1 g/l dans tous les exemples de cette partie expérimentale.

Ceci démarque cette étude des travaux cités en référence où des substrats autres que le sucre et apportés en quantités non négligeables (15 g/l de peptone, extrait de malt, extrait de levures...) sont cependant négligés dans l'établissement des rendements.

I. Effet de l'aération sur le rendement de la conversion (g de xylitol/ g de xylose) et la productivité en xylitol (g/l/h).

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- fermenteur de 2 ou de 20 l
- milieu synthétique composé de :
 - D-xylose : 50 g/l
 - KH_2PO_4 : 5 g/l
 - $(\text{NH})_2\text{SO}_4$: 2 g/l
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.4 g/l

- extrait de levure : 1 g/l (provenant de la société bioMérieux)

- inoculum : $3 \cdot 10^6$ cellules/ml de Candida parapsilosis ATCC28474

5 - pH : 4,5 (corrigé initialement par de l'acide orthophosphorique et régulé en continu par addition d'ammoniaque à 5%)

- température : 30°C

- agitation : 250 tr/min.

10 Les résultats obtenus en faisant varier l'aération sont résumés dans le tableau I qui suit.

TABLEAU I
Effet de l'aération

15	Aération (vvm)	Rendement en xylitol (g/g)	Productivité (g/l/h)
	0	Pas de fermentation	
20	0.2	0.66	0.24
	0.3	0.65	0.31
	0.4	0.67	0.32
	0.5	0.52	0.20
	0.7	0.5	0.18
25	1	Fin de la fermentation après 55 h (arrêt de la réaction dû à une aération excessive)	

30 II. Effet de l'utilisation d'un substrat carboné mixte xylose/glucose.

Des études effectuées, d'une part, sur un substrat synthétique contenant 50 g/l de D-xylose et, d'autre part, sur un substrat synthétique contenant 43 g/l de D-xylose et 7 g/l de glucose, les autres composants

35 du milieu étant les mêmes et dans les mêmes proportions

qu'indiqué sous I, ont montré que l'on pouvait améliorer à la fois le rendement et la productivité de la réaction de conversion du xylose en xylitol.

5

TABLEAU II

	Rendement xylitol/ xylose (g/g)	Productivité de synthèse du xylitol (g/l/h)
10 Culture sur xylose seul	0.54	0.31
15 Culture sur substrat mixte	0.58	0.40

III. Etude de la production en cultures succes-

20 sives :

Après une culture en discontinu ou en "batch", dans les conditions expérimentales décrites sous I, dès la fin de la réaction, on élimine le milieu de culture et les cellules restent dans le fermenteur puis on complète avec du milieu de culture frais de composition identique. Après épuisement du sucre, l'opération est renouvelée. Dans l'expérience décrite ici, cette opération est renouvelée cinq fois.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau III qui suit.

30

TABLEAU III

Production en cultures successives "Batches cycliques"

N° du cycle	1	2	3	4	5	total	moyenne
Durée (h)	95	66	55	53	49	318	-
Rendement de conversion en xylitol (g/g)	0.57	0.59	0.61	0.63	0.64	-	0.61
Rendement de synthèse de biomasse (g/g)	0.13	0.08	0.07	0.085	0.07	-	0.087
Productivité (g/l/h)	0.28	0.46	0.60	0.60	0.70	-	0.53

IV. Production sur milieu naturelConditions

- fermenteur : 2 ou 20 l
- milieu de culture : hydrolysate de sorgho obtenu par hydrolyse acide, concentration et filtration, comprenant 50 g/l de xylose, 14 g/l de glucose et 1 g/l d'extrait de levure ;
- pH : 4,5 (corrigé en continu) ;
- ensemencement : $3 \cdot 10^6$ cellules/ml ;
- aération : 0.3 volume d'air/volume de liquide/minute ;
- température : 30°C.

Dans ces conditions, la productivité est de 0.2 g/l/h et le rendement obtenu au bout de 72 h est de 0.72 g de xylitol/g de D-xylose.

V. Absence d'effet inhibiteur du xylitol sur sa propre production

Cette étude a été effectuée dans les conditions

décrites sous I, mais avec des concentrations initiales de xylitol variant de 0 à 100 g/l.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau IV qui suit.

5

TABLEAU IV

Influence de la concentration initiale en xylitol sur le rendement de conversion du D-xylose en xylitol et sur la productivité.

10

	Concentration initiale en xylitol (g/l)	0	20	60	80	100
15	Rendement en xylitol (g/g)	0,66	0,64	0,68	0,62	0,66
20	Productivité (g/l/h)	0,22	0,21	0,22	0,19	0,20

REVENDICATIONS

1. Procédé de production du xylitol à partir de D-xylose par action de la souche de Candida parapsilosis ATCC28474, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes
- 5 consistant à :
- 1°. cultiver un inoculum de $2 \text{ à } 5 \cdot 10^6$ cellules/ml de C. parapsilosis ATCC28474, en aérobie, à une température de 25 à 35°C, pendant le temps nécessaire à la consommation du sucre, à un pH maintenu dans la gamme de
- 10 3.8 à 5.4, dans un fermenteur contenant :
- soit un milieu synthétique comprenant
- 30 à 100 g/l de D-xylose,
 - 2 à 10 g/l de KH_2PO_4 ,
 - 1 à 5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, et
 - 15 - 0.1 à 1 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- soit un hydrolysât de matières premières végétales comprenant 50 à 80 g/l de D-xylose,
- en présence de 0.5 à 3 g/l d'extrait de levure,
- dans des conditions d'aération et d'agitation
- 20 assurant un apport en oxygène tel que la bioconversion du D-xylose en xylitol soit assurée, sans permettre la réutilisation du xylitol par la levure, et
- 2°. isoler le xylitol à partir du milieu de culture.
- 25 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'inoculum est de $3 \cdot 10^6$ cellules/ml.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la température de culture et de bioconversion est de 27 à 32°C, de préférence de 30°C.
- 30 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la durée de la culture est de 50 à 200 h.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le pH est réglé et maintenu à
- 35 4.5 pendant toute la durée de la culture.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'hydrolysât de matières pre-

mières végétales a été obtenu par hydrolyse chimique.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'extrait de levure est présent à raison de 1 g/l.

5 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la culture et la bioconversion sont effectuées sur un substrat carboné mixte contenant de préférence du glucose.

9. Procédé selon la revendication 8, caracté-
10 risé en ce que le substrat carboné mixte, dans un milieu synthétique, est constitué de :

- 90 à 95 % de xylose, et
- 10 à 5 % de glucose.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à
15 9, caractérisé en ce que les conditions d'aération sont de 0,25 à 0,45 volume d'air/volume de liquide/minute et les conditions d'agitation sont de 200 à 500 tr/min.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à
10, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre selon un
20 découplage partiel entre la croissance de la levure et la réaction de conversion du xylose en xylitol.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à
11, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre avec un apport programmé de substrat.

25 13. Fermenteur industriel pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il présente un volume de 200 à 10 000 litres et comprend essentiellement une cuve munie d'une ouverture à la partie supérieure, d'un système de vidange à la partie inférieure, d'un système de remplissage
30 commandé par une horloge ou un micro-ordinateur, avec éventuellement un capteur multiétagé permettant des apports successifs de milieu, d'un système de double régulation du pH par un acide et une base, d'un système
35 de régulation de la température interne, d'un système d'aération, d'un système d'agitation et d'un dispositif de mesure de l'oxygène à l'intérieur de la cuve.